

**T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ**

**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
KESİN RAPORU**

**Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH) veya
Bronşektazi Tanılı olgularda Bronş Epitel Hücrelerinin
Antibakteriyel Etkinliğinin Araştırılması**

Proje Yürütücüsü
Prof. Dr. Hatice Özenci

Proje Numarası
2003-0809109

Başlangıç tarihi
26.03.2003
Bitiş tarihi
26.03.2004

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara- '2003'

I.Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOA) veya Bronşektazi Tanılı Olgularda Bronş Epitel Hücrelerinin Antibakteriyel Etkinliğinin Araştırılması

Hasta (KOA ve Bronşektazi) ve kontrol grubu bronkealveolar lavaj sıvısından elde edilen bronşiyal epitel hücrelerinin ve makrofajlarının *S. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'ye karşı bakterisidal etkisini araştırmak amaçlanmıştır. Bunun için 16 hasta grubu ve 9 kontrol grubunun bronşiyal hücreleri kullanılmıştır. *S. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* ve bronşiyal hücreler deney için hazırlanmış, mikropklara eklenmiş ve 15 ve 60 dakika 37°C'de CO₂'li etüvde karşılaştırılmıştır. Bakteri üremesinin inhibisyonu koloni sayma yöntemi ile değerlendirilmiştir. Hasta grubu bronşiyal hücrelerinin bakterisidal etkisi *S. pneumoniae*'ye karşı % 27.7 ve *P. aeruginosa*'ye karşı % 23.2; kontrol grubu bronşiyal hücrelerinin *S.pneumoniae*'ye karşı bakterisidal etkisi % 29.5 ve *P. aeruginosa*'ye karşı % 23.2 olarak saptanmıştır. Çalışmamız sonucunda KOA ve Bronşektazi hastaları ve kontrol grubu bronşiyal epitel hücreleri ve makrofajlarının *S. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'ye karşı antibakteriyel etki gösterdiği saptanmıştır.

Search for anti-bacterial efficacy of bronchial epithelial cells in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease or Bronchiectasis

In this study we examined the bactericidal capacities of bronchial epithelial cells and macrophages obtained from the bronchoalveolar lavage fluid samples of patient group (COPD and Bronchiectasis) and control group against *S. pneumoniae* and *P. aeruginosa*. For this bronchial cells from 16 patient group and 9 control group were used. *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and bronchial cells were prepared for experiment, added to plate and incubated for 15 and 60 minutes in 37⁰C and 5% CO₂. The growth inhibition of bacteria was detected by quantitative colony counts method. Antibacterial effects of bronchial cells of patient group against *S. pneumoniae* was 27.7%, and against *P. aeruginosa* was 23.2%; the bactericidal effect of control group bronchial cells against *S. pneumoniae* was 29.5%, and against *P. aeruginosa* was 23.2%. We found that the bronchial epithelial cells and macrophages of patients with COPD and Bronchiectasis and controls have an antibacterial activity to *S. pneumoniae* and *P. aeruginosa*.

II. Amaç ve Kapsam

Erişkin bireyde 400 m²'lik yüzey ile vücudun besin maddeleri, toksinler, allerjenler ve mikroorganizmalar ile karşılaşan en geniş bölgesinin mukozalar olduğu bilinmektedir. Mukozal yüzeyler mikroorganizma girişinin gerçekleştiği bölgelerdir. Bir antijen, vücuda en sık solunum sistemi yoluyla giriş yapmaktadır; solunum sistemi dış ortamla çok sıkı temas halindedir, gaz değişimi ve metabolik işlevlerinin yanısıra havadaki gazlara, partiküllere, yabancı maddelere, mikroorganizmalara karşı da vücudu korumak zorundadır.

Solunum sisteminde mukozal yüzeylerde mukus akımı, mukozal hümmoral immün savunma(Ig A, Ig G), mukozal pH değişiklikleri ile bakteriyel tutunmanın engellenmesi, normal floranın mikrobiyal bileşimi, öksürme ve yutma refleksi, sürfaktan içeren alveolar sıvı, alveolar makrofaj ve nötrofiller, mukosilyer aktivite bu savunma mekanizmaları içinde yer alır.

Üst hava yolları, özellikle de burun geçişi, solunan mikroorganizmalara karşı anatomik ve mekanik bir bariyer konumu sergiler. Üst havayolları (nazofarinks ve orofarinks) normal olarak yoğun mikrobiyal flora ile kolonize olmuştur. Nazofarinkteki epitel mukuslu silyer hücrelerden oluşmuştur. Böylelikle üst havayollarında epitel yüzeylerinde biriken mikroorganizmalara karşı mukosilyer bir bariyer oluşturulmuştur. Mukosilyer etki ile organizma, mikroorganizmayı nazofarinksten ileri orofarinkse doğru kovar; ya öksürme ile dışarı atar yada yutma ile sindirim sistemine geçişine neden olup yok eder. Çok çeşitli mekanizmalar farinksteki temizlenmeye katkıda bulunur: Dil kapanma mekanizması ve öksürme refleksi, orofarinksten alınan bakterilere karşı birincil savunma mekanizmasıdır. Bu mekanizmaların herhangi birinde meydana gelen yapısal veya nörolojik bozuklukta, normalde steril olan üst solunum sistemi, farinks sekresyonları ile tekrar tekrar kontaminasyona açık hale gelir.

Geniş hava yollarının dallanan yapısı, solunan bakterilere etki edebilecek ek yüzey sağlamaktadır. Hapşırma ve öksürme, ana hava yolları ve nazofarinksteki partiküllerden temizlenmeyi artırır. Mukosilyer sistem ile birlikte bu faktörler, steriliteyi geniş hava yollarında sürdürmede önemli rol oynarlar.

Mukosilyer merdivenin ana bileşeni; trakea, bronş ve terminal bronşiollerdeki mukus tabakası ve silialı hücrelerdir. Silialı epitel respiratuar bronşiolle kadar uzanmıştır ve bu bölgelerde yoğunluğu santral hava yollarına göre nispeten artmıştır. Silialar, hücre yüzeyinde hareket yeteneğine sahiptir. Silianın hareketi –bidirectional- santral hava yollarına doğru ani hızlı hareket ve takiben kendine özgü konumuna yavaş dönüş şeklindedir. Bu düzenlenmiş hareket, mukus tabakasını santral hava yollarına yok edilmek üzere itmek için anahtardır. Periferik silyalar, santral hava yollarındaki silyalardan daha yavaş harekete sahiptir.

Hava yolu mukusu, yüzeyde visköz mukus tabakası ve onun altında daha az visköz mukus tabakasından oluşur. Silia normal olarak üst, az visköz mukus tabakası vasıtasıyla hareket eder; daha az visköz mukus tabakası ile santrale itme işlemini yapar. Bu bileşimlerden herhangi biri bozulursa, sekresyonu temizlemede siliyer görev yeterli olmaz ve konak tekrarlayan infeksiyonlara maruz kalır. Siliyer yapı, fonksiyon, uyum veya mukus içeriği değişirse bakteriye karşı temizleme mücadelesi üst hava yollarında yeterince etkili olmaz ve tekrarlayan solunum yolları infeksiyonu oluşur.

Mukus submukozal bezlerin, goblet hücrelerinin ve Clara hücrelerinin salgısıdır. Partiküllü maddelerin mukosilyer klirensle temizlenmesi ana işlevidir. Solunan havayı nemlendirme, havayollarından sıvı kaybını önleme, kayganlığı sağlama, epitelin dış ortamla ilişkisini engelleme, mikroorganizmaları tutma, toksik gazları nötralize etme ve içinde bulunan immünglobulinler, laktoferrin ve lizozim gibi maddelerle antibakteriyel etki göstermek işlevleri arasındadır. Mukusun % 99'u su, elektrolitler, inorganik bileşikler, karbohidratlar, serum proteinleri, çözünebilen protein ve lipidlerden oluşur. Musin denilen yüksek molekül ağırlıklı polianyonik polimerlerle proteoglikanlar birleşerek mukusun matriksini yaparlar. Seröz hücreler solunum yolu sıvısında musinin yanısıra musin dışı proteinlerin üretiminden de sorumludur. Bunların arasında en önemlileri lizozim ve laktoferrindir.

Lizozim, submukozal epitelyal bezlerin seröz hücrelerinden ve alveoler makrofajlardan salgılanır. Bakteriolitik etkilidir. Bakteri hücre duvarının peptidoglikanlarını harap eder. Laktoferrin, solunum yolu epitelinde submukoza

bezlerinde ve aktive nötrofillerde üretilir. Demiri azaltarak bakteriyostatik etki gösterir, direkt mikrobisidal etkisi de vardır.

Intrapulmoner immün sistem hücreleri lenf bezleri ve mukozal lenf nodüllerinde ya da alveoler ve bronkovasküler interstisyumda izole olarak bulunurlar. Proksimal bronşlara komşu pek çok lenf bezi vardır. Mukozal lenfoid dokunun gastrointestinal sistemde olduğu gibi lokal Ig A sentezinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Trakeobronşial salgılarda tüm immünglobülinler bulunmakla birlikte, IgG ve IgA daha yoğundur. Ig A lokal olarak sentezlenirken , IgG serumdan transüstasyonla alınır.

Ig A en çok bulunan immünglobulindir ve daha çok sekretuar (dimerik) formdadır. Lamina propria ve trakeobronşial bezlerin bağ dokusundaki B hücreler tarafından üretilir. Pek çok görevi vardır: opsonizasyon, fagositozun kolaylaştırılması, kompleman aktivasyonu, toksin nötralizasyonu ve mikrobiyal aglutinasyon.

Siliyaların içinde bulunduğu mukus iki tabaka halinde bulunur: Siliyaların içinde hareket ettiği 5 μ kalınlığındaki sol tabaka ve bu tabakanın üzerinde yüzen ve siliyer hareketle orofarinkse sürüklenen 2 μ kalınlığındaki gel tabaka. Gel tabaka içeriği ve fiziksel özelliklerinden dolayı fiziki, kimyasal ve biyolojik bir bariyer olarak görev yapar. Fibriler yapısından dolayı partikülleri yakalar. Vizkosite ve elastisite özellikleri partiküllerin yapışmasını sağlar. Yüksek su içeriği ile havayı nemlendirir ve yüksek lipid içeriği su geçirmesini önler. Mukus pH'sı 6-8 arasındadır ve asitleri tamponlar. Gel tabaka içinde IgA gibi immünglobulinler ve lizozimler bulunduğundan yüksek ölçüde bakterisidal bir etki yapar ve böylece mukozayı mikroorganizmalara karşı korur. Sol tabaka siliyer aktivite için gereklidir. Siliyalı hücrelerden ve klara hücrelerinden salgılandığı düşünülmektedir. Miktar ve içeriği siliyer aktivite ve transport için gereklidir.

Mukusun kalınlığı ve içeriği perifere doğru değişir. Terminal bronşiolardan sonra düşük makromoleküler komponentli ince bir zar haline gelir. Günde ortalama transport edilen mukus yaklaşık 10 ml'dir. Kronik bronşit alevlenmelerinde bu miktar 200-300 ml/gün'e çıkar; ayrıca mukusun vizkositesi artarak elastisitesi azalır. Etkili bir transport ve koruma için mukus vizkositesinin ve elastisitesinin optimum olması gerekir.

Solunum mukusu ile bakteriyel etkileşimin analizinde önemli bir gözlem, bazı solunum patojenlerinin daha fazla müsin sekresyonunu uyaran ürünler hazırlaması ve serbestlemesi ve/veya ölü dokular aracılığıyla ya da siliyer salınmayı bozarak ve hatta epitele zarar vererek mukosilyer iletimle etkileşime girmesidir. Böylelikle bakteriler, enfekte hava yollarında çoğalmalarını ve kalıcı olmalarını sağlayan bir çevrenin gelişimine yol açarlar.

Artık bazı bakterilerin siliyaların salınmasını bozarak ya da yavaşlatarak mukosilyer klirense zarar veren bazı faktörler ürettikleri bilinmektedir. Bu siliya inhibitör faktörlerden bazıları belirlenmiştir: *P.aeruginosa* piyosiyenin, 1-hidroksi-fenazin ve ramnolipid; *H.influenzae* düşük molekül ağırlıklı glikopeptidler ve *S. pneumoniae* pnömölizin üretmektedir.

Mukosilyer klirensteeki yetersizliğin, inhale edilen zararlı çevresel mikroorganizmalar ve zararlı maddelerin respiratuvar yüzeye ve daha derin hücrelere penetre olabilmeleri için yeterli bir süreyle solunum mukozasıyla temas halinde kalarak hastalık başlangıcında önemli bir kademe oluşturduğunu anlamak kolaydır.

Solunum sistemin doğal savunması fiziksel, hücresel ve antimikrobiyal bileşenlerden oluşur. Bu savunma profesyonel immün sistemin (makrofaj, T ve B hücreleri) koordinasyonunu gerektirmemektedir. Bu koordinasyonu sağlamada epitel hücrelerine önemli bir rol düşmektedir.

Vücudun epitelyal yüzeyleri enfeksiyona karşı ilk savunma hattını oluşturur. Konak ile dış çevre arasındaki üç temel bariyer; deri, gastrointestinal mukoza ve solunum yolları mukozasıdır. Her üçü de iç dünya ile patojenlerden oluşan dış dünya arasında fiziksel bir bariyer oluşturmaktadır. Tight junctionları ile birlikte epitel hücresi dış ortama karşı etkin bir engel oluşturmaktadır ve kontrollü ve seçici geçişe izin vermektedir. Epitel hücre bariyeri tight junctionlar ile apikal ve bazal olarak bir araya getirilmiştir, zar ve parasellüler mesafe genellikle büyük moleküllere geçirgen değildir. Tight junctionlar di- ve tripeptidlerin geçişini engeller. Sadece iyonlar geçme yeteneğine sahiptir. İnflamasyon durumunda tight junctionlar, büyük moleküllerin alttaki lamina propriaya geçişine izin veren 'tight-sıkı' özelliğini kaybeder.

Epitel bütünlüğünün kaybı enfeksiyona zemin hazırlamaktadır. Enfeksiyon sadece patojen, epitelyal yüzeylere kolonize olduğunda veya bu bariyerleri geçtiğinde meydana gelir. Patojen girişi sıklıkla epitelin iç yüzeylerinden gerçekleşir. Yara ve yanıklarda olduğu gibi bariyer kırıldığında mikroorganizma mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır; böylelikle epitelin enfeksiyona karşı savunmadaki önemi açıkça görülmektedir. Yüzeyel dokuların sağlam olduğu, bütünlüğün bozulmadığı durumlarda patojen epitelyal bariyeri iç epitel yüzeyinde bulunan moleküllere bağlanarak geçer; bu yüzeylere tutunarak veya kolonize olarak enfeksiyon oluşturabilir. Bu özgül tutunma patojenin epitel hücrelerini infekte etmesine veya hasarlandırmasına izin verir; böylece epitel geçilebilir. Patojenin kolonizasyonu durumunda hava ve sıvı akımı ile epitelyal yüzeylerden geçiş mümkün olabilir .

Epitel hücresi sadece fiziksel bariyer değildir. Epitel hücresi sınırlar, sinyal iletim mekanizmaları ve mikroplara karşı etkili bir reaksiyon gösteren efektör moleküller ile dinamik bir konak savunma mekanizması sergilemektedir.

Yüzeyel epitel; mikrobisidal veya mikrobiyal üremeyi durduran kimyasal bileşenler oluşturur. Örnek olarak, bir antibakteriyel enzim olan lizozim; gözyaşı ve tükürük içerisinde sekrete edilmektedir. Midenin asit pH'sı ve üst sindirim yollarının sindirim enzimleri enfeksiyona karşı önemli kimyasal bariyer oluşturmaktadır. Ayrıca sindirim yollarının alt bölümlerinde kriptidin veya defensin olarak adlandırılan antibakteriyel ve antifungal peptidler panet hücreleri tarafından yapılmaktadır. Yabancı ajana yanıt olarak oluşturulan bu medyatörler, fagositik hücrelere ve inflamatuvar yanıtta katkıda bulunur.

Katyonik peptidler bakteriyel hücre zarını hasarlandırarak bakteriyi öldürür. Sürfaktan A ve D proteini gibi antimikrobiyal proteinler akciğerin epitelyal yüzeylerine sekrete edilmekte ve bu proteinler patojene bağlanıp patojenin yüzeyini kaplamaktadır; böylece patojen akciğer alveollerine girdiğinde karşılaşılan makrofaj tarafından daha kolay fagosite edilmektedir (opsonizasyon). Bu olay konak için bir savunma stratejisi oluşturmaktadır.

Antimikrobiyal peptidlerden en iyi bilineni defensinlerdir. Defensinler nötrofil granüllerinde bol miktarda bulunur ve bakteri ve mantarların büyük bir kısmını

öldüren geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Defensinlerin sentezi, mikroba yanıtta makrofaj ve diğer hücreler tarafından oluşturulan IL-1 ve TNF-alfa gibi inflamatuvar sitokinlerin yanıtını artırır. Defensinlerin patojene karşı doğal ve erken immün yanıtındaki rolleri antimikrobiyal etki ile sınırlı değildir. Nötrofil defensinlerinin serumda serbest durumda iken opsonin gibi davrandığı rapor edilmektedir. Böylece defensinler doğal ve kazanılmış immünite arasında bağlantı görevi görmektedir.

Epitel hücresi; mikrobiyal hücre duvarlarının özgül ortak yapıları ve mikrobun yaşamı için temel olan, memeli hücrelerinde bulunmayan doğal immün yanıtın ve epitelin güçlü uyarıcı durumundaki molekülleri (patojen ilişkili moleküler paternler-PAMP) tanır. Gram negatif bakterilerin lipopolisakariti ve gram pozitif bakterilerin peptidoglikan ve teikoik asit yapıları patojenle ilişkili moleküler paternlerdir. Epitel, patern tanıyan reseptörler- toll-like reseptörler (TLR) yolu ile birçok mikrobiyal yapıyı tanır ve hücrel sinyal yanıtını başlatır. Yapılan çalışmalarda kolon epitel hücrelerinin peptidoglikan ve lipopeptidi tanıyan TLR4'ü eksprese ettiği gösterilmiştir.

Epitel hücresi profesyonel olmayan fagositler şeklinde bakteri saldırısına karşı savunmada rol alır. MHC sınıf I ve sınıf II molekülü eksprese eder ve immün hücrelere antijen sunumunu kolaylaştırır. MHC sınıf I moleküllerinin ekspresyonu sitotoksik aktivasyona, MHC sınıf II moleküllerinin ekspresyonu immün yanıt veya toleransa neden olur. Ayrıca salgıladığı medyatörler ile profesyonel antijen sunan hücreleri uyarır ve yanıtını güçlendirir. Epitel hücresi bu yönleri ile makrofaja benzetilebilir; immün yanıtı aktivasyon veya tolerans yönünde yönlendiricidir.

Epitel hücresi doğal immünitede görevli çeşitli sitokinler sekrete eder ve bu özelliği mikroorganizmaya karşı konak savunmasına yardımcı olur. Epitel hücrelerinin salgıladığı sitokinler; IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , TGF- α , TGF- β , IFN. Mukozal yüzeylerden bakterinin invazyonu, infeksiyon bölgesine polimorfonükleer lökositlerin hızlı akışına neden olur. Bu yanıtın epitel hücresinin oluşturduğu kemotaktik uyarı sorumludur. Kemokinler, nötrofiller de dahil olmak üzere pek çok fagositik hücrenin epitele göç etmesine yol açar. Böylece kemokinler doğal immün yanıtın kazanılmış yanıt dönüşü için lenfosit trafiğinin esas düzenleyicisi olur.

Ek olarak epitel hücreleri, PMNL'ler için hedef olan adezyon moleküllerinin ekspresyonunu düzenler. Epitel hücresi, inflamatuvar yanıtın oluşumunda aktive PMNL'lere yardım eder. Monosit göçü inflamatuvar hastalıklarda kritik bir olaydır. Alveolar epitel hücreleri akciğere monosit akımına katkıda bulunur. Epitel hücresinin mikroorganizma ile infeksiyonu monosit adezyonunu ve monositin epitelden migrasyonunu başlatır, endotelial yüzeylerde ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonunu artırır. *Moraxella catarrhalis* ve *Haemophilus influenzae*'nin solunum epiteli ile direkt etkileşiminin ICAM-1 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Solunum epiteli inhale edilen patojene karşı fiziksel ve immünolojik bariyer oluşturmaktadır. Normal kontakta doğal savunmalar etkin mukosilyer temizlenme ve antimikrobiyal etki ile inflamasyonun aktivasyonu ile bakteriye karşı korumaktadır.

Solunum yollarının silli epitelinin görevi, sillerin hareketi ve salgılanan mukusla birlikte mukosilyer aktivite (klirens) ile yabancı partiküllerin dışarı atılmasını sağlamaktır. Ayrıca çeşitli fagositik hücrelerin yanısıra bronş salgıları içinde bulunan lizozim, laktoferrin, transferrin, alfa-1 antitripsin, interferon, fibronektin, komplemanlar ve immünglobulinler mikroorganizmalara karşı nonspesifik immün yanıtta görev alırlar.

Solunum yolları, üst solunum yollarında sinüslerden nazofarenkse, aşağı solunum yollarında ise trakeadan solunumsal bronşiyollere kadar yalancı çok katlı siliyalı epitelle döşelidir. Siliyer sistem havayolu yüzeyini yabancı maddelerden temizler. Bu olay mukusun ve bu mukusu ağız yönüne iten epitel hücrelerinin silyalarının ortak fonksiyonu ile gerçekleşir. Silyaların solunum sisteminin fizyolojisi üzerinde oynadığı önemli rol nedeniyle, trakea ve primer bronşlarda önde gelen hücre tipinin silyalı epitel hücresi olması şaşırtıcı değildir.

Solunum sisteminde ve diğer sistemlerde; epitel hücre dökülmesi ile vücut yüzeyine yapışmış pek çok mikroorganizma azaltılmış olur. Epitel hücresinin yarı ömrü 30 saattir. Epitele tutunan mikroorganizma, epitelin dökülmesi sırasında atılmakta ve böylece konaktan uzaklaştırılmaktadır.

Solunum yolu epitel hücreleri havayollarında en çok sayıda bulunan hücrelerdir ve bakteriyel infeksiyona yanıt verecek ve infeksiyon ile baş edecek karmaşık sinyal

yollarına sahiptir. Bunlar muhtemelen *S.aureus* ve *P.aeruginosa* gibi yaygın fırsatçı patojenlere karşı surveillance görevi göstermede oldukça önemlidirler.

Akciğerin immün hücreleri; makrofaj, PMN ve epitel hücreleridir. Makrofaj konak-bakteri etkileşiminde santral rol oynamaktadır. Bunlar akciğerde normal sağlıklı bireylerin nonparankimal en başta gelen hücreleridir ve solunum yolu inflamasyonunun önemli düzenleyicisidirler. Alveolar makrofajların fonksiyonları yüksek hareket, fagositik aktivite, reseptör ekspresyonları ve kemokin ve sitokin ekspresyonu yolu ile diğer immün hücrelere sinyal iletmeleri yolu ile olmaktadır. Bunların bir kısım görevleri organizma veya sitokinle özgül olarak aktive edilmedikçe geri dönmektedir. Aktive olduğunda alveolar makrofajlar enzim (asit hidrolaz, nötral hidrolaz ve lizozim), araşidonik asit ürünleri, reaktif oksijen metabolitleri ve diğer biyoaktif peptidleri organizmayı öldürmek ve diğer immün hücreleri uyarmak için oluşturmaktadır. Böylelikle makrofajların solunum yollarında antijen sunan hücrelerin fonksiyonlarını düzenlemektedir.

PMN'ler akciğerde patojenle kaşılaştıktan sonra görev alan en önemli hücrelerdir. Bunların primer görevi patojeni tanımak, fagosit etmek ve yok etmektir. Patojen PMN'nin fagozomunda peptid ve reaktif oksijen ara ürünlerinin ekspresyonu yolu ile sindirilmekte ve öldürülmektedir. Nötrofiller bakterinin öldürülmesinde ve inflamatuvar yanıtta önemli olan lipit medyatörler, lökotrienler ve reaktif oksijen ürünlerini salgılar. PMN elastaz solunum yolu hücrelerinden epitelyal IL-8 ekspresyonunun güçlü bir uyarandır ve devam eden inflamasyonun başlatılmasına yardımcı olmaktadır.

T hücre aracılı adaptif immün cevapta antijen sunan hücreler olarak makrofajların fonksiyonları vardır. Sindirilmiş mikroorganizmayı içeren makrofajlar farklılaşmış T hücrelerine mikrobial antijenleri sunarlar. Efektör T hücreleri de makrofajların mikroorganizmaları öldürmelerini aktive eder. Bu işlem intrasellüler mikroorganizmalara karşı hücre sel immünitenin ana mekanizmasıdır. Mononükleer fagositler hem doğal hem de adaptif immünitede önemli efektör hücrelerdir. Doğal immünitede etkili fonksiyonları, mikroorganizmaları fagosit etmek, sitokin oluşturmak ve diğer inflamatuvar hücreleri aktive etmektir.

Bakteriyel ürünlere yanıtta makrofajdan salınan önemli sitokinler IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 ve TNF- α ' dır. TNF- α , lokal inflamatuvar yanıtta indükleyicidir ve sistemik etkilere

sahiptir. IL-8, nötrofillerin enfeksiyon alanına çekilmesine yardımcı olarak lokal inflamatuvar yanıtta katkıda bulunur. IL-12, NK hücreleri aktive eder ve CD4-T hücrelerinin T-helper 1 hücresine farklılaşmasını sağlar. Böylelikle adaptif immüniteye geçişte rol almış olur. Yine makrofaj kaynaklı sitokin ve kemokinler; nötrofillerin kandan enfeksiyon alanına göçünü sağlarlar.

Makrofajlar, kazanılmış immün yanıtın efektör evrelerinde de rol oynarlar. Hücrel immünitede antijen ile uyarılan T hücreleri makrofajları fagosite ettikleri mikropları yok etmek için uyarırlar. Hümorale immünitede, mikroorganizmayı antikora kaplar veya opsonize eder ve antikora karşı olan makrofaj yüzey reseptörleri yolu ile mikropların fagositozunu başlatırlar.

Çeşitli hastalıklarda solunum yollarının klirensi bozulur; bu hastalıkların başında kronik bronşit, bronşektazi, kistik fibrozis ve astım gelir. Çocukluk çağı alt solunum yolu enfeksiyonları hem bronşektazi, hem de KOAH için sayılan risk faktörleri arasındadır. Geçirilmiş enfeksiyonlar pulmoner fonksiyon, gelişme ve savunma mekanizmalarında bozulmaya neden olur.

Tanı konmuş KOAH olgularında tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları mevcut fonksiyonel bozulmayı hızlandırır ve geri dönüşsüz değişikliklere neden olur; ancak KOAH'ın da solunum yolu enfeksiyonlarının sıklığını ve ağırlığını arttırdığı olasılığı da tartışılmaktadır. Pek çok KOAH'lı olgu enfeksiyon tedavisi sonrası alevlenme öncesi durumuna dönebilmektedir. KOAH ve bakteriyel enfeksiyon ilişkisi 'kısır döngü' hipotezi ile açıklanmaktadır. Buna göre bakteriyel ürünler ve konakçının savunma mekanizmaları fonksiyonel bozulmanın ilerlemesine neden olur; çünkü bakteriyel enfeksiyon yada kolonizasyon lokal proteolitik hasara yol açar ve bronkoobstrüktif olay ilerler. Ayrıca havayolu epitelinin hasarı konakçı savunma mekanizmalarını bozar, tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlara yada kolonizasyona neden olur. Artık kısır döngü başlamıştır. Aynı hipotez bronşektazi için de geçerlidir. Varolan yapısal değişiklikler tekrarlayan enfeksiyonlarla ilerler ve fonksiyonel bozulma artar.

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden ve son zamanlarda hücrel ve moleküler açıdan dikkati çekmeye başlayan bir hastalıktır. Alt solunum yolları ve alveollerde kronik inflamasyon; alveolar makrofaj, nötrofil ve

sitotoksik T lenfositleri sayısında azalma ve çoklu inflamatuvar medyatörlerin (lipid, kemokin, sitokin, büyüme faktörleri) salınımında azalma ile karakterizedir.

KOAH hastalarında epitel hücrelerinin çeşitli sitokin, kemokin salınımlarında ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunda artma olduğu rapor edilmiştir. Bu sitokin ve adezyon molekülleri KOAH'da nötrofil infiltrasyonuna ve hava yolu hasarına katkıda bulunmaktadır.

Hasarlı havayolu epitelinin onarımı ve yara iyileşmesi fibronektin gibi ekstrasellüler matriks proteinleri ile ilişkilidir. Bazı sitokinlerin fibronektini uyardığı (TGFB gibi), bazılarının da (IL-4 gibi) baskıladığı rapor edilmiştir.

Makrofajlar normal akciğerde ve KOAH gibi kronik inflamasyon sırasında predominant savunma hücreleridir. Nötrofil, T lenfositleri, eozinofil ve mast hücrelerini içeren diğer immün ve inflamatuvar hücreler proteolitik doku hasarına katılmaktadır.

KOAH'ın oluş mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. İnsan hücresi ile bakterinin etkileşimi infeksiyon sürecinin başlamasında esas adımı oluşturur. Bu etkileşim; tutunma, virülans faktörlerinin enjeksiyonu, konak hücresinin sinyal mekanizması yolu ile hedef hücreye sinyal iletimi ve internalizasyonun başlatılması yolu ile olmaktadır.

Solunum yollarındaki bakteri varlığı solunum epiteline zarar verir. Farklı bakteri türlerinin toksik ürünleri silyalı epitel hücreleri ve/veya Goblet hücrelerini yerlerinden çıkararak onların ölümüne neden olurlar. Epitel bütünlüğünde bölgesel olarak oluşan bu hasar bakterilerin ortaya çıkan yeni reseptörlere bağlanmalarını kolaylaştırır. Sentezi yeni yapılmış olan ve onarım aşamasındaki hava yolu epiteli tarafından salgılanan bir molekül olan fibronektin, *P.aeruginosa*, *H.influenzae* ve *S.pneumoniae*'nin hasarlanmış havayolu epiteline adezyonu için önemli bir bölge oluşturmaktadır.

Streptococcus pneumoniae gram-pozitif fakültatif anaerob bir bakteridir. İyi gelişmiş bir kapsülü vardır. Kimyasal farklılıklar ve polisakarid içeriğine bağlı olarak 90 antijenik varyantı saptanmıştır. Pnömoniler sıklıkla tip 8, 4, 5, 12, 3, 1, 7 ve 9 ile oluşur. Tip 3 genellikle yaşlı bireylerde pnömoninin ve kronik bronşit alevlenmelerinin nedenidir.

Streptococcus pneumoniae, dünyada invaziv akciğer infeksiyonlarının en sık nedenlerindedir. Kolonize pnömokoklar solunum epitelinin altına geçince invaziv infeksiyon oluşur. Pnömokokkal hastalığın patofizyolojisinin anlaşılması epitel hücre invazyonunun moleküler ve hücresel temelini anlaşılmasını gerektirmektedir.

P. aeruginosa gram-negatif, kapsülsüz çomaktır. Hastane kökenli pnömonilerin en sık nedenlerindedir. Ayrıca yapısal akciğer hastalığı (kronik bronşit, bronşektazi) olan bireylerde en sık alevlenme nedenlerindedir. *P. aeruginosa* duyarlı bireylerde akut ve kronik infeksiyonlara neden olabilmektedir. Bronşiektazili bireylerde etken olan patojenler arasında en sık görülenlerden biri olan *P.aeruginosa* aynı zamanda KOAH'ın hem durağan evresinde hem de alevlenme sırasında etkili olmaktadır.

P. aeruginosa genel olarak sağlam dokuyu infekte etmemektedir. Sadece normal savunma mekanizmalarının yokluğunda veya mikst enfeksiyonun varlığında patojenik olmaktadır. Sigara içimi *P. aeruginosa* kolonizasyonuna ve akciğer infeksiyonuna eğilimi arttırmaktadır. *P. aeruginosa*, belirli durumlarda fırsatçı patojen olarak etki edebilen yaygın bulunan gram negatif basildir. Müsin, epitel hücresi ve ekstraselüler matriksteki kendine özgül reseptörleri tanıyarak insan dokusuna tutunabilir.

Bu noktalardan hareketle; çalışmanın amacı bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısında bulunan epitel hücrelerinin ve makrofajlarının *S. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'ye karşı bakterisidal etkisini araştırmak ve kontrol grubu bronşiyal hücreleri ile KOAH ve Bronşektazi hastalarındaki hücrelerin antibakteriyel etkisi arasında farklılığın olup olmadığını araştırmaktır Böylelikle KOAH ve Bronşektazi hastalarının solunum sistemlerinin doğal immün yanıt mekanizmasında bozukluk olup olmadığını araştırılması amaçlanmıştır.

.

II. Materyal ve Yöntem

Katılımcılar.

Mart 2003 – Kasım 2004 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Kliniğinde KOAH veya Bronşektazi tanısıyla izlenen, hemoptizi etyolojisi, artmış ve nedeni bilinmeyen dispne, öksürük şeklinin değişmesi nedeniyle endobronşiyal lezyon araştırılması gereken, bu yüzden bronkoskopi yapılan yaşları 28 ile 75 arasında olan 4'ü sigara kullanan 13 Bronşektazi ve 1'i sigara kullanan 3 KOAH hastasının bronş lavajı alındı. Kontrol grubu olarak bilinen bir akciğer hastalığı olmayan, kuru öksürük etyolojisi araştırılan, posteroanterior akciğer grafisinde ya da çeşitli nedenlerle çekilen bilgisayarlı toraks tomografisinde nodüller saptanan, bu nedenlerle bronkoskopi yapılan yaşları 39 ile 61 arasında olan 1'i sigara kullanan 9 hastanın bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısı hücreleri kullanıldı.

Bronkoalveolar lavaj sıvısının alınması.

Çalışmaya dahil edilme kriterlerine uyan hastaların üst solunum yollarına, fiberoptik bronkoskopi (FOB) uygulanmadan önce, %2'lik 5-10 mL prilokain ile nebulizatörle lokal anestezi yapıldı. Olympus BF 1T-240 tipi fiberoptik bronkoskop ile trakeobronşiyal ağaç gözden geçirildikten sonra, daha önce radyolojik yöntemlerle lezyon saptanan lob bronşundan 15-20 cc serum fizyolojik ile bronş lavajı alındı. Tüm olgular işlemi sorunsuz olarak tolere ettiler ve herhangi bir yan etki görülmedi.

***Streptococcus pneumoniae*'nin elde edilmesi.**

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619 suşu 37° C'de koyun kanlı agar besiyerinde bir gece üretildi. Ertesi gün agardan bir öze dolusu mikroorganizma toplanarak phosphate buffer saline (PBS) ile sulandırıldı. Mikroorganizma PBS içinde 3000 rpm'de 3 kez 10'ar dakika santrifüj edilerek yıkandı, çökelti %10 Feetal calf serum içeren Minimal Essential Medium (CM) içinde sulandırıldı. Bakteri tripan mavisi boya testi uygulanarak mililitrede 1×10^5 bakteri olacak şekilde CM içine ilave edildi.

***Pseudomonas aeruginosa*'nın elde edilmesi.**

Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145 suşu 37° C'de adi agar besiyerinde bir gece üretildi. Ertesi gün agardan bir öze dolusu mikroorganizma toplanarak PBS ile sulandırıldı. Mikroorganizma PBS içinde 3000 rpm'de 3 kez 10'ar dakika santrifüj edilerek yıkandı, çökelti CM içinde sulandırıldı. Bakteri tripan mavisi boya testi uygulanarak mililitrede 1×10^5 bakteri olacak şekilde CM içine ilave edildi.

Bronşiyal hücrelerinin elde edilmesi.

Hasta ve kontrol grubundan alınan 20 ml bronş lavajı sıvıları penisilin-streptomisinli Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) içeren steril santrifüj tüpüne alındı ve buz içinde laboratuara taşındı. 3 kez HBSS içinde 1200 rpm' de 4° C'de 10 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Hücreler taze çalışıldı veya % 15 DMSO içeren FCS içinde donduruldu ve daha sonra çözülerek çalışıldı. Çalışılacak hücreler tripan blue ile boyanarak mililitresinde 10^5 canlı hücre (epitel hücresi ve yuvarlak hücre) olacak şekilde CM içine ilave edildi.

Üremeyi engelleme deneyi:

Bronş lavajından elde edilen hücrelerin mikrobisidal etkilerine daha önceden tanımlandığı şekilde bakıldı. Kısaca; hazırlanan mikroorganizma süspansiyonundan 96 kuyucuklu mikropklara 100 µl üçer kuyucuk olacak şekilde konuldu. Bronş lavajı hücre süspansiyonundan kuyucuklara 100 µl efektör hücre/ hedef hücre oranı 1/1 olacak şekilde eklendi. Kontrol olarak *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve bronşiyal hücreler tek başına kullanıldı. Kontrol kuyucuklarındaki hücrelerin üzerine besiyeri ilave edildi. Mikroplak 37°C %5 CO₂'li etüvde 15 ve 60 dakika inkübe edildi. Süre sonunda her bir kuyucuktaki örneklerden seri sulandırım yapıldı ve uygun sulandırmılardaki *S. pneumoniae* koyun kanlı ve *P. aeruginosa* adi agar plaklarına ekildi. 37°C'de bir gecelik inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün plaklarda oluşmuş koloni oluşturan birimler (KOB) sayılarak bakterisidal etki yüzdesi şu formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ üremenin engellenmesi} = \frac{\text{KOB (kontrol kuyucuk)} - \text{KOB (deney kuyucuğu)}}{\text{KOB (kontrol kuyucuk)}} \times 100$$

Temas önleme deneyi

Üremenin engellenmesinin efektör hücre/ hedef hücre teması sonucu ortaya çıkıp çıkmadığını araştırmak için, efektör hücre ile hedef hücre arasındaki fiziksel teması önleme testi uygulandı. Bu amaçla kuyucuklara mikroorganizma süspansiyonu konduktan sonra, kuyucukların içine 0,4 µm por çaplı ayırıcı (Milipor) yerleştirilerek efektör hücreler bu ayırıcının üzerine eklendi. Kontrol olarak kullanılan kuyucuklardaki ayırıcının üzerine efektör hücre içermeyen besiyeri ilave edildi. İnkübasyon ve bakterisidal etkinin hesaplanması üremenin engellenmesi deneyinde olduğu şekilde yapıldı.

III. Analiz ve Bulgular

Yaşları 28 ile 75 arasında değişen 13 Bronşektazi hastası, 3 KOAH hastası ve 9 kontrol grubunun klinik tanıları, BAL sıvılarındaki canlı hücre sayısı (epitel hücresi ve yuvarlak hücre) ve taze veya donmuş çalışıldıklarına dair özellikler tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Hasta ve kontrol grubu hastalarının klinik tanıları, BAL sıvılarındaki canlı hücre sayısı ve taze veya donmuş olarak çalışıldıkları gösterilmiştir.

Hasta adı (yaşı)	Hastalığı (sigara kullanımı)	Hücre sayısı	Nasıl çalışıldığı
1. Melek Yalman (71)	Bronşektazi	10 ⁶ yuvarlak h	Taze
2. Bekir Yenici (75)	Bronşektazi	5x10 ⁵ yuvarlak h	Donmuş
3. Bekir Özdemir (75)	Bronşektazi	5x10 ⁵ yuvarlak h	Donmuş
4. Gülsevil Topçu (28)	Bronşektazi	5x10 ⁵ yuvarlak h	Taze
5. Şevket Özmen	Bronşektazi	10 ⁶ yuvarlak h	Taze
6. Mehmet Özkök (54)	Bronşektazi Sigara (+)	10 ⁶ yuvarlak h	Taze
7. Bayram Akyıldız (73)	Bronşektazi Sigara (+)	10 ⁵ yuvarlak 2x10 ⁴ epitel h	Donmuş
8. Sebahattin İpek	Bronşektazi	4x10 ⁵ yuvarlak 2x10 ⁴ epitel h	Taze
9. Mehmet Kula (53)	Bronşektazi Sigara (+)	3x10 ⁵ yuvarlak 2x10 ⁴ epitel h	Taze
10. Ebru Şen (38)	Bronşektazi	4x10 ⁵ yuvarlak 2x10 ⁴ epitel h	Donmuş
11. Bayram Koçak	Bronşektazi	4x10 ⁴ yuvarlak h	Donmuş
12. Şükrü Bedir (50)	Bronşektazi Sigara (+)	1x10 ⁵ yuvarlak h	Donmuş
13. Özcan Yalçiner (65)	Bronşektazi	4x10 ⁵ yuvarlak h	Donmuş
14. Endercan Ünal (44)	KOAH	5x10 ⁵ yuvarlak 10 ⁴ epitel h	Donmuş
15. Hacer Kılıç (52)	KOAH	2x10 ⁴ yuvarlak 8x10 ⁴ epitel h	Donmuş
16. Ali Beceren (72)	KOAH Sigara(+)	3x10 ⁵ yuvarlak h	Donmuş
17. Mehmet Çakır (48)	Kontrol Sigara (+)	2x10 ⁵ yuvarlak h	Donmuş
18. Yusuf Buyurgan (44)	Kontrol	5x10 ⁵ yuvarlak 5x10 ⁴ epitel h	Donmuş
19. Sündüz Gürbüz (61)	Kontrol	10 ⁶ yuvarlak h	Donmuş
20. Abdurrahman Gözenoğlu (54)	Kontrol	2x10 ⁵ yuvarlak 3x10 ⁴ epitel h	Taze
21. Mustafa Uysal (52)	Kontrol	5x10 ⁵ yuvarlak h	Taze
22. Alaattin Albayrak (39)	Kontrol	1x10 ⁵ yuvarlak h	Donmuş
23. Fatma Konut	Kontrol	1x10 ⁵ yuvarlak h	Donmuş
24. Şehnaz Taşkiran (57)	Kontrol	6x10 ⁴ yuvarlak 4x10 ⁴ epitel h	Donmuş
25. Güner Erdiñç (55)	Kontrol	5x10 ⁵ yuvarlak h	Donmuş

13 Bronşektazi hastası, 3 KOAH hastası ve 9 kontrolün *S. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'ye 1/1 efektör hücre/hedef hücre oranında 15. ve 60. dakika bakterisidal etki gösterdiği saptanmıştır. Hasta ve kontrollerin *S. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'ye 15. ve 60. dakikada gösterdiği bakterisidal etki tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. 13 Bronşektazi hastası, 3 KOAH hastası ve 9 kontrolün *S. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'ye 1/1 efektör hücre/hedef hücre oranında 15. ve 60. dakikadaki bakterisidal etki yüzdesi gösterilmiştir.

Hasta adı (yaşı)	15' S.pneumoniae	15' P.aeruginosa	60' S.pneumoniae	60' P.aeruginosa
1. Melek Yalman (71)	%19	%30	%23	%20
2. Bekir Yenici (75)	%12	%28	%20	%22
3. Bekir Özdemir (75)	%17	%22	%20	%08
4. Gülsevil Topçu (28)	%60	%30	%38	%45
5. Şevket Özmen	%56	X	%67	X
6. Mehmet Özkök (54)	%26	X	%54	X
7. Bayram Akyıldız (73)	%21	%10	%14	%13
8. Sebahattin İpek	%39	%20	%32	%25
9. Mehmet Kula (53)	%21	%10	%43	%13
10. Ebru Şen (38)	%51	%60	%19	%40
11. Bayram Koçak	%17	%17	%14	%16
12. Şükrü Bedir (50)	%37	%32	%08	%13
13. Özcan Yalçiner (65)	%33	%20	%10	%14
14. Endercan Ünal (44)	%21	%28	%19	%20
15. Hacer Kılıç (52)	%17	%27	%34	%08
16. Ali Beceren (72)	%57	%36	%25	%29
17. Mehmet Çakır (48)	%30	%21	%15	%06
18. Yusuf Buyurgan (44)	%22	%16	%20	%16
19. Sündüz Gürbüz (61)	%09	%16	%20	%16
20. Abdurrahman Gözenoğlu (54)	%40	%28	%20	%20
21. Mustafa Uysal (52)	%18	%22	%25	%19
22. Alaattin Albayrak (39)	%22	%48	%20	%29
23. Fatma Konut	%59	%48	%24	%28
24. Şehnaz Taşkıran (57)	%65	%22	%78	%12
25. Güner Erdiñç (55)	%19	%24	%26	%26

X: Laboratuvar şartları nedeniyle değerlendirilememiş olan veriler.

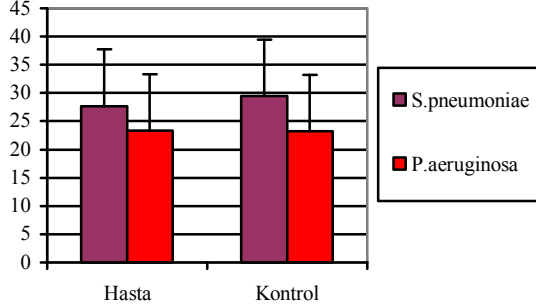
Çalışmada *S. pneumoniae* ATCC 49619 ve *P.aeruginosa* ATCC 10145 suşuna karşı bronşial hücrelerin antibakteriyel etki gösterdiği saptanmıştır. 1/1 efektör/hedef hücre oranında üremenin engellenmesi deneyi sonucu, 13 Bronşektazi hastasının bronşial hücrelerinin bakterisidal etkisinin *S. pneumoniae*'ye karşı 15. dakikada ortalama % 28.2, 60.dakikada ortalama % 27.8, *P. aeruginosa*'ye karşı 15.dakikada ortalama % 25.3, 60.dakikada ortalama % 20.9; 3 KOAH hastasının bronşial hücrelerinin bakterisidal etkisinin *S. pneumoniae*'ye karşı 15. dakikada ortalama % 23.6, 60.dakikada ortalama % 26.0, *P. aeruginosa*'ye karşı 15.dakikada ortalama % 27.0, 60.dakikada ortalama % 20.4 olduğu saptanmıştır. 9 kontrolün bronşial hücrelerinin bakterisidal etkisinin *S. pneumoniae*'ye karşı 15. dakikada ortalama % 31.5, 60.dakikada ortalama % 27.5, *P. aeruginosa*'ye karşı 15.dakikada ortalama % 27.2, 60.dakikada ortalama % 19.1 olduğu saptanmıştır. *S. pneumoniae* ATCC 49619 ve *P. aeruginosa* ATCC 10145 suşuna karşı 1/1 efektör/hedef hücre oranında üremenin engellenmesi deneyi sonucu, 13 Bronşektazi, 3 KOAH hastasının ve 9 kontrolün bronşial hücrelerinin bakterisidal etkisinin ortalamaları tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. *S.pneumoniae* ATCC 49619 ve *P.aeruginosa* ATCC 10145 suşuna karşı 1:1 efektör/ hedef hücre oranında üremenin engellenmesi deneyi sonucu, 13 Bronşektazi, 3 KOAH hastasının ve 9 kontrolün bronşial hücrelerinin bakterisidal etkisinin ortalamaları % olarak gösterilmiştir.

	<i>S. pneumoniae</i> 15. dakika	<i>S. pneumoniae</i> 60. dakika	<i>S. pneumoniae</i> ortalama	<i>P. aeruginosa</i> 15. dakika	<i>P. aeruginosa</i> 60. dakika	<i>P. aeruginosa</i> ortalama
Bronşektazi hastaları ortalaması	28.2	27.8	28.0	25.3	20.9	23.1
KOAH hastaları ortalaması	23.6	26.0	24.8	27.0	20.4	23.7
Hasta ortalaması	27.8	27.5	27.7	25.7	20.7	23.2
Kontrollerin ortalaması	31.5	27.5	29.5	27.2	19.1	23.2

S. pneumoniae ATCC 49619 ve *P. aeruginosa* ATCC 10145 suşuna karşı 1/1 efektör/hedef hücre oranında üremenin engellenmesi deneyi sonucu, 16 hastanın ve 9 kontrolün bronşial hücrelerinin bakterisidal etkisinin ortalamaları şekil 1'de gösterilmiştir.

Şekil 1. 1/1 Efektör/Hedef hücre oranlarında hasta ve kontrol grubu BAL hücrelerinin *S. pneumoniae* ATCC 49619 ve *P. aeruginosa* ATCC 10145'e karşı bakterisidal etki yüzdesi.



Efektör ve hedef hücre arasındaki fiziksel temas engellendiğinde BAL sıvısından elde edilen hücreler *S. pneumoniae* ATCC49619 ve *P. aeruginosa* ATCC10145 suşlarına karşı bakterisidal etki göstermemiştir. Bakterisidal etki için fiziksel temas gerektiği sonucuna varılmıştır.

İstatistiksel değerlendirme Mann-Whitney testi ile yapılmıştır. Bronşiyal hücrelerin *S. pneumoniae* ATCC 49619 ve *P. aeruginosa* ATCC10145 suşlarına hasta ile kontrol grubunun göstermiş olduğu bakterisidal etkiler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Bronşiyal hücrelerin *S. pneumoniae* ATCC 49619 ve *P. aeruginosa* ATCC10145 suşuna karşı gösterdikleri bakterisidal etkiler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

V. Sonuç ve Öneriler.

13 Bronşektazi ve 3 KOAH'lıdan oluşan hasta grubu ile 9 kontrol grubunun bronşial epitel hücreleri ve makrofajları *S. pneumoniae* ATCC 49619 ve *P. aeruginosa* ATCC 10145 ile 1/1 efektör hücre/hedef hücre oranında 15 ve 60 dakika 37°C ve %5 CO₂'li ortamda kültür plaklarında karşılaştırılmıştır. Üremenin engellenmesi deneyi sonucunda her iki grubun epitel hücreleri ve makrofajlarının *S. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'ye karşı bakterisidal etki gösterdiği saptanmıştır. 13 Bronşektazi hastasının bronşial hücrelerinin bakterisidal etkisinin *S. pneumoniae*'ye karşı 15. dakikada ortalama % 28.2, 60.dakikada ortalama % 27.8, *P. aeruginosa*'ye karşı 15.dakikada ortalama % 25.3, 60.dakikada ortalama % 20.9; 3 KOAH hastasının bronşial hücrelerinin bakterisidal etkisinin *S. pneumoniae*'ye karşı 15. dakikada ortalama % 23.6, 60.dakikada ortalama % 26.0, *P. aeruginosa*'ye karşı 15.dakikada ortalama % 27.0, 60.dakikada ortalama % 20.4 olduğu saptanmıştır. 9 kontrolün bronşial hücrelerinin bakterisidal etkisinin *S. pneumoniae*'ye karşı 15. dakikada ortalama % 31.5, 60.dakikada ortalama % 27.5, *P. aeruginosa*'ye karşı 15.dakikada ortalama % 27.2, 60.dakikada ortalama % 19.1 olduğu saptanmıştır.

Efektör ve hedef hücre arasındaki fiziksel temas engellendiğinde bronşiyal hücrelerin *S. pneumoniae* ATCC 49619 ve *P. aeruginosa* ATCC 10145 suşlarına karşı bakterisidal etki göstermediği görülmüştür. Bakterisidal etki için fiziksel temasın gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

Sigara kullanan hasta veya kontrol grubu bireylerinin bronşiyal hücrelerinin bakterisidal etkinliği ile kullanmayanların hücrelerin oluşturmuş olduğu bakterisidal etki arasında, sigara kullanımı ile ilişki kurulabilecek bir korelasyon saptanmamıştır.

Üremenin engellenmesi deneyinin taze veya dondurulmuş ve çözülmüş hücreler ile çalışılması bakterisidal etki oranlarında değişime neden olmamıştır. Aynı bireylerin bronşiyal hücreleri hem taze çalışılmış, hem de dondurulup çözülerek çalışılmış ve bakterisidal etkilerinin değişmediği görülmüştür.

Üremenin engellenmesi deneyinde kullanılan bronşiyal epitel hücreleri ile yuvarlak hücrelerin (makrofaj ve lökositler) oranı değişmekle birlikte, her deneyde kullanılan

toplam bronşiyal hücre sayısı 1×10^5 /mililitre olarak ayarlanmış ve bu şekilde deneyler yapılmıştır. Bronşiyal hücrelerin farklı oranlarda kullanılması bakterisidal etkide anlamlı değişikliklere neden olmamıştır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar hafif hastalık ve hafif hastalığın alevlenmesi sırasında bronşiyal hücrelerin inflamatuvar sürecinin ve yapısal değişikliklerinin karakterize edilmesi noktasında toplanmıştır. Sigara içen normal akciğer fonksiyonları olan ve sigara içmeyen KOAH'lı hastaların bronşiyal biopsi ve akciğer parankimlerinin analizi, KOAH'ın patogenezinin daha iyi bilinmesine katkısı olan farklı inflamatuvar ve yapısal hücrelerin ve bunların sinyal iletim yolları ve medyatörlerinin rolleri ile ilgili yeni ufukların açılmasına neden olmuştur. Stefano ve arkadaşlarının yaptığı araştırma KOAH hastalarının akciğer patolojilerinde çeşitli klinik durumlarda predominant olan önemli inflamatuvar hücre fenotiplerini özetlemiştir. Şiddetli KOAH'ta total ve aktive nötrofiller predominant hücreler olarak dikkati çekmişken; T lenfositleri, özellikle CD8+ hücreler ve makrofajlar sağlıklı sigara içenlerde ve hafif dereceli KOAH hastalarında akciğerin yaygın inflamatuvar hücreleri olarak görülmüştür. NF- κ B, STAT-4 ve IFN- γ proteinlerinin yanı sıra endotelden endotelial adezyon molekülü-1 ekspres eden CD4+, CD8+ ve makrofajlar hafif dereceli hastalıkta artmıştır. Aksine, şiddetli KOAH'lılarda aktive nötrofiller ve artmış nitrotilozin immünreaktivitesi görülmüştür. KOAH alevlenmesi sırasında alınan bronş biyopsilerinde, artmış T hücre ve granülosit infiltrasyonu gösterilmiştir. Yüksek doz inhale kortikosteroid tedavisi hafif şiddetteki KOAH hastalarının bronşiyal biyopsilerindeki inflamatuvar hücre sayılarında değişime neden olmamıştır. Akciğer parankiminin görünümü de bronşiyal biyopsi ile benzer bulunmuştur. Sağlıklı sigara içicileri hafif hastalıklı bireyler periferik havayollarında artmış T lenfosit infiltrasyonu göstermiştir. Hafif ve şiddetli hastalıkta nötrofil ve lenfosit yoğunluğunu etkileyen moleküler mekanizma daha geniş çaplı araştırmayı gerektirdiği sonucuna varılmıştır.

Hafif dereceli KOAH hasta bronşiyal biyopsileri, inflamatuvar hücre infiltrasyonunda sağlıklı sigara içmeyen bireylere göre artış göstermiştir. Bu hastalarda bronşiyal mukozada temel hücrelerin CD8+ T hücreleri ve makrofajlar olduğu konusunda pek çok araştırmacı hemfikirdir. Hafif derecedeki hastalar sigara içen sağlıklılarla kıyaslandığında bu hücreler açısından anlamlı fark göstermemektedirler. Sigara içen sağlıklıların bronşiyal biyopsi örneklerinde CD8+ T hücre sayısı içmeyenlere göre

daha yüksek bulunmuştur. Ancak bu hücrelerin fonksiyonel aktivitesi çalışılmamıştır. Liu ve arkadaşları fare CD8+ sitotoksik T hücrelerinin alveolar epitel hücrelerine karşı perforin gibi TNF-alfa bağımlı ve Fas-L bağımsız sitolitik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Bu invitro çalışma invivo ortama uyarlanacak olursa sigara içen bireylerin bronşial mukozalarındaki CD8+ T hücreleri, CD8+ hücrelerinin yüzdesinin sınırlanması kısıtlanabilecek ve TNF-alfa üretimi ve salınımına bağlı olabilecektir.

NF-κB'nin epitelyal ve nükleer ekspresyonu sigara içmeyenler ile kıyaslandığında hafif KOAH'ta artmıştır ve daha az da sigara içenlerde artmıştır. NF-κB'nin nükleer ekspresyonu IL-6, IL-8, MCP-1, TNF-alfa ve ICAM-1 gibi bazı proinflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunu düzenler.

Hafif KOAH'ta ELAM-1'in endotelde ve ICAM-1 ve IL-8'in bronşial epitelde artmış olduğu rapor edilmiştir. Subepitelyal bazal membranın sigara içen ve içmeyen sağlıklılarla kıyaslandığında KOAH hastalarında benzer olduğu veya birazcık artmış olduğu rapor edilmiştir.

Şiddetli KOAH hastalarında mononükleer hücrelerin ve granülositlerin migrasyonunu ve aktivasyonunu başlatan makrofaj inflamatuvar proteini-1'i ve myeloperoksidaz immünreaktivitesi artmış olarak bulunmuştur. Submukozada nötrofiller ve makrofajlar artmış, T lenfositleri azalmıştır. Bronşiyal dokuda T hücre sayısı azalmıştır ve T hücre aracılı immün yanıt bozulmuş olabilir.

Drannik ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sigaranın bakteriyel klirens etkisini değerlendirmek için fareler 6-8 hafta boyunca haftada 5 gün günde 2 sigaraya maruz bırakılmış ve bu hayvanlara 10000 cfu canlı *P. aeruginosa* intranazal inoküle edilmiştir. Dumana maruz bırakılan hayvanlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında akciğerdeki bakteriyel yük seviyeleri bakteriyel inokülasyondan 4 ve 12 saat sonra anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Her iki grup hayvan da 24 saat sonra bakteriyi temizlemiştir.

Sigaraya maruz bırakılan hayvanların *P. aeruginosa* ile infeksiyonundan sonraki klinik durumun alevlenmesinin ve inflamasyon artışının olup olmadığını gözlemlemek için BAL'da hücresel bileşenler değerlendirilmiştir. BAL'da en yüksek inflamasyon hem sigaraya maruz bırakılan hem de bırakılmayan farelerde *P. aeruginosa*

inokülasyonundan 12 saat sonra gözlenmiştir. İki grup birbiri ile karşılaştırıldığında, sigara alan farelerin total hücre sayıları 12 ve 24 saat sonra anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Artmış inflamasyon sigara içicilerinde 12 saat sonra nötrofillerin sayısında anlamlı artış ile karakterize olarak görülmüştür. 24.saatte mononükleer hücrelerin sayısında anlamlı artış görülmüştür.

Sitokin seviyelerine bakıldığında sigaraya maruz bırakılan hayvanların proinflamatuvar sitokin (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) ve kemokin (MCP-1, MIP-1) seviyelerinde bakteriyel inokülasyondan 12 saat sonra anlamlı artışın olduğu görülmüştür. MCP-1 seviyesi 4.saatte anlamlı olarak yükselmiştir.

Fareler 8 hafta sigaraya maruz bırakıldıktan sonra alveolar makrofajları alınmış ve LPS ile uyarılmıştır. Sigaraya maruz bırakılan grubun TNF- α ve IL-6 yanıtları kontrol grubuna göre belirgin olarak düşük bulunmuştur. Aynı şekilde *P. aeruginosa*'ya verdikleri yanıt da düşük bulunmuştur.

Laan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada sigara içiminin bronşial epitel hücresinden lipopolisakkaridle indüklenen inflamatuvar sitokinlerin üretimini aktivatör protein 1'in etkinleşmesini baskılayarak inhibe ettiğini göstermişlerdir. Kronik sigara içimi KOAH hastalığına katkıda bulunan bakteri ile kronik kolonizasyona neden olan havayollarında immün baskılayıcı değişiklikler ile karakterizedir. Bu immün baskılanmaya neden olan mekanizma çok fazla tanımlanamamıştır. Bu çalışma sigara içiminin bronşial epitel hücrelerinden endotoksin (LPS) ile indüklenen inflamatuvar sitokin üretimini inhibe edip etmediği, böylelikle bu etkinin ardındaki mekanizmanın ne olduğu araştırılmıştır. BEAS-2 hücre kültürü sigara ekstraktı ile muamele edilmiş, bronşial epitel hücrelerinin doza bağımlı olarak LPS ile indüklenen GM-CSF ve IL-8 protein salgılamasında azalma tespit edilmiştir. Ek olarak, LPS ile indüklenen transkripsiyon faktör AP-1'in aktivitesi –fakat NF κ B'nin değil- sigara ekstraktı ile muameleden sonra aşağı çekilmiştir. Not olarak bu sigara maruziyetinde hücre kültürünün canlılığında sayısal olarak değişim olmamıştır. Bu veriler sigara içiminin hava yollarında AP-1'in aktifleşmesinin baskılanması yolu ile patojen ile indüklenen nötrofili etkinleştiren sitokin oluşumunun düşürülmesi ile immün baskılayıcı özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur. Böylelikle bu çalışma sigara içiminin bakteri kolonizasyonuna ve kronik obstrüktif akciğer hastalığına nasıl katkıda bulunduğunu açıklamaya ışık tutmuştur.

Tüm bu bulgular sigara içiminin immün sistemi baskıladığını düşündürmüştür. İnfeksiyon ajanlarının inefektif olarak temizlenebildiğini ve uzamış inflamasyon sergilediklerini göstermiştir. Böyle süreçler sigara içimi ile ilişkili KOAH gibi hastalıkların patogeneze katkıda bulunuyor olabilir.

Gaga ve ark. yaptıkları çalışmada, bronşektazili ve sağlıklı kontrol grupta, bronş mukozasında artmış hücresel infiltrasyon saptamışlardır. Bronşektazili grupta mononükleer hücrelerin sayıca belirgin olduğu dikkati çekmiştir. Kontrol grupta ise nötrofil, makrofaj ve T-lenfositler eşit sayılarda bulunmuştur. Her iki grup arasındaki en çarpıcı fark bronşektazideki mononükleer hücre ve makrofaj hakimiyetiyle giden yoğun hücresel birikim, belirgin nötrofili ve IL-8'deki belirgin artıştır.

Owen ve ark. bronşektazideki yoğun mononükleer infiltrasyonunun, artmış CD11/CD18 integrin aracılıklı monosit-fibronektin adhezyonuna bağlı olduğunu göstermişlerdir. Nötrofiller bronşektazideki bronşial hücresel infiltratın diğer karakteristik komponentidir. IL-8'in önemli bir nötrofil kemoatraktan olduğu kistik fibrozis, bronşektazi ve kronik bronşitli hastaların balgam incelemelerinde gösterilmiştir ve nötrofillerin havayollarında birikmesinde etkili olduğu ileri sürülmüştür. Zheng ve ark. havayolundaki artmış makrofaj aktivitesinin TNF α salgılayarak havayoluna nötrofil akışına yol açtığını ve bunun da bronşektazi patogenezinde önemli rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Vücudun çeşitli bölgelerindeki epitel hücrelerinin mukozal yüzeylerdeki doğal ve kazanılmış immün cevabın düzenlenmesinde oynadığı aktif rol son yıllarda anlaşılmaya başlamıştır. Çeşitli çalışmalarda fare vaginal epitel hücrelerinin *Candida albicans*'ın üremesini engellediği, İnsan oral epitel hücrelerinin *C. albicans*'ın üremesini hücre-hücre teması ile engellediği, CaCo2 intestinal epitel hücrelerinin çeşitli candida türlerinin üremesini engellediği gösterilmiştir. Üriner epitel hücrelerinin *E.coli*'ye karşı bakterisidal etkisinin farklı mikroorganizma miktarlarında farklı olduğu bulunmuştur. Üriner ve oral epitel hücrelerinin farklı *E. coli* suşlarına karşı bakterisidal gücü araştırılmış ve ağız epitel hücrelerinin antibakteriyel etkinliğinin üriner hücrelerinkinden daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Çeşitli çalışmalar epitel hücreleri tarafından oluşturulan β -defensinler gibi çeşitli antimikrobiyal peptidlerin farklılaşmış aktivitesinin, kistik fibrozisteki epitelin bakteriyi yüzeyinden temizlemedeki yetersizliğine katkıda bulunabileceğini düşündürmüştür. Singh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bronşiyal epitel hücreleri otopsi örneklerinden alınmış, epitel hücreleri IL-1 β ile uyarılmış ve defensin üretimi ölçülmüştür. Defensinlerin *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal etkinliği değerlendirilmiştir. Çalışmalar sonucunda IL-1 β ile uyarımın bronşiyal epitel hücrelerinden β -defensin üretimini arttırdığı ve bu antimikrobisyonların mikroorganizmaları doza bağımlı olarak öldürdüğü gösterilmiştir.

Cortes ve arkadaşları çalışmalarında, akciğer epitel hücrelerinin *K.pneumoniae* pnömonisinde alımdaki rolünü ve bakteri ve epitel hücresi arasındaki etkileşimin *K. pneumoniae* pnömonisinin patogeneze katkıda bulunup bulunmadığını araştırmışlardır. *K. pneumoniae* insan akciğer karsinoma hücrelerinin tip II pnömositlerden elde edilen monolayeri (A 459; ATCC185) ile infekte edilmiştir. Fareler de *K. pneumoniae* ile infekte edilmiş, bakteriyemi 2, 4 ve 6. günlerde değerlendirilmiş, 7 gün hayatta kalan hayvanların veya deney sırasında ölen hayvanların akciğer, dalakları çıkarılıp ve kantitatif bakteriyel kültür yapılmıştır. Bu çalışmada *K. pneumoniae*'nin farklı tiplerinde ve farklı kapsülasyon derecelerinde insan akciğer epitel hücrelerine farklı internalize olduğunu klinik izolasyonda tespit edilmiştir. Sonuçlar kapsülasyon derecesinin, bakterinin akciğer epitel hücrelerine girişini ayarladığını düşündürmüştür.

Phycavant ve arkadaşları *K. pneumoniae* dış membran proteini A (kpOmpA)'nın bronşiyal epitel hücrelerini (BEC) aktivasyonunu ve nötrofilin etkinleştirilmesine etkisini araştırmışlardır. kpOmpA'nın bronşiyal epitel hücrelerine etkisini görmek için adezyon molekülü ve sitokin ekspresyonları değerlendirilmiştir. Bu mekanizmanın kmOmpA ile indüklenen akciğer inflamasyonuna potansiyel etkisi araştırılmıştır. İn vitro çalışmalar sonucu kmOmpA'nın bronşiyal epitel hücrelerine sıkıca tutunduğu ve bu tutunmanın NF- κ B sinyal yolunda aktivasyon ile sonuçlandığı gösterilmiştir. kmOmpA'ya maruz bırakılan bronşiyal hücreler ICAM-1 ekspresyonunda, IL-6 sekresyonunda ve kemokin ligandlarında artış göstermiştir. kmOmpA'yı farelere intratekal olarak verdiklerinde 24 saat içinde BAL ve akciğer sekresyonlarında geçici nötrofili saptanmıştır. BAL'da 6 saat içinde ICAM-1, CXCL1, CXCL5, CXCL10 ve IL-6 ekspresyonunda artış

saptanmıştır. Bu sonuçlar kmOmpA'nın konak savunmasındaki yerinin sadece APC'yi etkinleştirmek ile değil aynı zamanda akciğer nötrofili ile sonuçlanan BEC'in etkinleşmesini de içerdiğini göstermiştir.

Doran ve arkadaşları yaptıkları çalışmada grup B streptokokkal β hemolizinlerin insan akciğer epiteline invazyonu ve IL-8 salınımını uyardığını göstermişlerdir. Gram pozitif hücre duvar bileşenlerinin (örnek; lipoteikoikasit, peptidoglikan) konak akciğer epitel hücrelerinden sitokin cevabını uyardığı gösterilmiştir. Sonuçlar β -h/c'nin yüksek bakteriyel yoğunlukta akciğer epitel hücrelerine direkt sitolitik olduğunu göstermiştir. Düşük bakteriyel yoğunlukta β -h/c'nin, GBS'nin akciğer epitel hücrelerine intraselüler invazyona ve burada nötrofil kemoatraktanı IL-8 salınımını başlatmasına katkıda bulunduğunu göstermiştir. GBS A549 hücrelerinden IL-8 salınımını doz ve zaman bağımlı bir şekilde gerçekleştirmekte ve β -h/c etkinliği bu indüksiyona katkıda bulunmuştur.

Frick ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Haemophilus influenzae*'nin solunum epitel hücrelerinden ICAM-1 ekspresyonunu uyardığını göstermiştir. İn vitro hücre kültüründe *H. influenzae* ile uyarımdan sonra IL-8 ve ICAM-1 ekspresyonunda artış saptanmıştır. Aksine IL-1 β , TNF α ve MHC sınıf I ekspresyonunda artma görülmemiştir. ICAM-1'in uyarılması direkt epitel hücreleri yüzeyi ile bakterinin etkileşimini gerektirmektedir. Bu yanıt için fonksiyonel rolle tutarlı olarak ICAM-1'in *H. influenzae* uyarımı, epitel hücre yüzeyine nötrofil aderansinde artış ile ilişkili görülmüştür. Bu sonuç insan solunum epitel hücrelerinin ICAM-1 ekspresyonunun epitel hücrelerinin *H. influenzae* ile etkileşimiyle uyarıldığını ve ICAM-1 bağımlı bir mekanizmanın bu hücrelere diğer hücrelerden salınan inflamatuvar medyatörlere bağlı olmadan aracılık ettiğini göstermiştir. Özgül epitel hücre genlerinin (IL-8 ve ICAM-1 gibi) bakteriyel infeksiyon ile direkt uyarımı solunum yollarında hızlı ve tekin bir doğal savunmaya olanak vermektedir.

Behçet hastalığı olan olgularda, ilk savunma bölgesi olan ağız mukozası epitel hücrelerinin streptokoklara karşı bakterisidal etkinliğinin, sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede düşük olduğu gösterilmiştir. Ağız epitel hücrelerinin *S. pyogenes*'in üremesini engellemesi sağlıklı bireylerde % 34, Behçet hastalarında % 0.08 bulundu.

Behçet hastalarında epitel hücresi bakterisidal etkisinin kontrollere göre anlamlı derecede düşük olduğu gösterilmiştir. Behçet hastalarının neden daha sık infeksiyon geçirdiği sorusu böylelikle epitel hücresinin antibakteriyel etkisinin azalması ile açıklanabilmektedir.

Alveol epiteli, makrofajları ve nötrofilleri ile ilgili yapılan çalışmalar akciğerin KOAH ve Bronşektazi gibi kronik hastalıklarının hücresel değişimlerini; hücresel değişimler ve sigara gibi çevresel faktörlerin çeşitli mikroorganizma kolonizasyonu ile ilişkilerinin daha iyi anlaşılması bu hastalıkların immünpatogenezini aydınlayabilecek ve böylelikle tedavi rejimlerinin daha sağlıklı düzenlenebilmesi mümkün olacaktır. Ne yazık ki günümüzdeki inflamasyon için yapılan tedaviler sadece nötrofillerin hasarlı alana göçünü kontrol altına almaktadır. Bununla birlikte nötrofil, epitel hücresi ve makrofajlar tarafından yürütülen bu mekanizmaların daha iyi anlaşılması ile çok yönlü ve bazen kuvvetten düşürücü inflamasyon durumu daha iyi kontrol altına alabilecek farmakolojik ajanlar geliştirilebilecektir.

VI. Kaynaklar

Abbas AK, Lichtman AH: Innate Immunity, Chapter 12, pp. 275-298. Jason Malley (ed), Cellular and Molecular Immunology. 2002, fifth edition. Saunders, Philadelphia.

Acheson DWK and Luccioli S. Mucosal Immune Responses. Best Practice and Research Clinical Gastroenterology. 2004; 18 (2): 387-404.

Adamou JE, Wizemann TM, Barren P and Langermann S. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to Human Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B). Infect Immun, 1998; 66(2):820-822.

Albayrak N, Biriken D and Özenci H: İdrar epitel hücresinin farklı miktarlardaki *Escherichia coli*'ye bakterisidal etkisinin araştırılması, S19, pp. 85. I. Ulusal Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar Sempozyumu. 1-4 Nisan 2004. Pine Bay Resort Hotel, Kuşadası.

Albayrak N, Biriken D and Ozenci H. Investigation of bactericidal effects of human oral and uroepithelial cells. Turkish Journal of Immunology. 2004; 9 (2): pp179.

Azghani AO et al. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. Microbial pathogenesis. 2002; 33: 109-114.

Barnes PJ, Shapiro SD and Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. Eur Respir J, 2003; 22:672-688.

Berin CM, Mckay DM, Perdue MH. Immune-epithelial interactions in host defense. Am J Trop Med Hyg.1999; 60 (4): 16-25.

Cakan G et al. S-carboxymethylcysteine inhibits the attachment of *Streptococcus pneumoniae* to human pharyngeal epithelial cells. Microbial pathogenesis. 2003; 34: 261-265.

Cortes G et al. Role of lung epithelial cells in defense againsts *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. Infection and Immunity. 2002; 1075-1080.

Cywes C et al. CD44 as a receptor for colonization of the pharynx by group A *Streptococcus*. J Clin Invest. 2000; 15; 106(8): 995–1002.

Darling KEA et al. Effects of nitric oxide on *Pseudomonas aeruginosa* infection of epithelial cells from a human respiratory cell line derived from a patient with cystic fibrosis. Infection and Immunity. 2003; 2341-2349.

Dolapçı İ, Albayrak N, Boyvat A and Özenci H. Antibacterial capacity of oral (epithelial) cells from healthy donors and patients with Behçet's disease. Archives of Dermatological Research. 2003; 295: 124-126.

Dongari A et al. *Candida albicans* triggers IL-8 secretion by oral epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*. 2003; 34: 169-177.

Doran KS et al. Group B streptococcal beta heolysin / cytolyisin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of IL-8. *The Journal of Infectious Disease*. 2002; 185: 196-203.

Drutz DJ. Host defence at body surfaces. *Immunity and Infection*. 2000: 209-211.

Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infection and Immunity*. 1993; Volume 61, Issue 11: 4569-4574.

Eisenstat JB, Jorens PG, Hebert CA, et al. Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway diseases. *Am J Physiol* 1993;264:L413-L418.

Fink J et al. Proinflammatory effects of *Burkholderia Cepacia* on cystic fibrosis respiratory epithelium. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2003; 38: 273-282.

Frick AG et al. *Haemophilus influenzae* stimulates ICAM-1 expression on respiratory epithelial cells. *The Journal of Immunology*. 2000; 164: 4185-4196.

Gaga M et al. Increases in CD4 T lymphocytes, macrophages, neutrophils and interleukin 8 positive cells in the airways of patients with bronchiectasis. *Thorax*. 1998; 53: 685-691.

Ganz T. Epithelia: Not just physical barriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99 (6); 3357-3358.

Hagimoto N et al. TGF-beta1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *The Journal of Immunology*. 2002; 168: 6470-6478.

Hagiwara Y et al. Protective mucosal immunity in aging is associated with functional CD4 T cells in NALT. *The Journal of Immunology*. 2003; 170: 1754-1762.

Hamzaqui N, Pringault E. Interaction of microorganisms, Epithelium, and lymphoid cells of the mucosa-associated lymphoid tissue. *Annals New York Ann N Y Acad Sci*. 1998; Nov 17: 859: 65-74.

Hedges S, Agace W, Swanborg C. Epithelial cytokine responses and mucosal cytokine network. *Trends Microbiol*. 1995;3: 266-270.

Hickman-Davis JM et al. Lung surfactant and reactive oxygen-nitrogen species: antimicrobial activity and host-pathogen interactions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001; 281: L517-L523.

- Hodge S, Hodge G, Holmes M, Flower R and Scicchitano R.** IL-4 and TNF inhibit TGF production in a human bronchial epithelial cell line: Possible relevance to inflammatory mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*, 2001; 6(3):205.
- Humlicek AL, Pang L, Look DC.** Modulation of airway inflammation and bacterial clearance by epithelial cell ICAM-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Sep;287(3):L598-607.
- Huttner KM, Bevins CL.** Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defence. *Pediatric Research*. 1999; 45(6): 785-794.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M:** Innate Immunity, Chapter 2. Penelope Austin (ed), *Immunobiology*. 2001, 5th ed. Garland Publishing, New York and London.
- Kılıçturgay K:** İmmünglobulinler, pp.81-97. Kaya Kılıçturgay (ed), *İmmünoloji*. 2003, 3.baskı. Nobel, Bursa.
- Kılıçturgay K:** Doğal Direnç, pp. 203-248. Kaya Kılıçturgay (ed), *İmmünoloji*. 2003, 3.baskı, Nobel, Bursa.
- Knowles MR and Boucher RC.** Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest*. 2002 March 1; 109(5): 571–577.
- Lee HY et al.** Antimicrobial activity of innate immune molecules against *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and nontypeable *Haemophilus influenzae*. *BMC Infect Dis*. 2004; 4: 12.
- Li N et al.** Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. *The Journal of Immunology*. 2002; 169: 4531-4541.
- Mahida YR.** Epithelial cell responses. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*. 2004; 18 (2): 241-253.
- Mavris M and Sansonetti P.** Epithelial cell responses. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*. 2004; 18 (2): 373-386.
- Mayer L.** Current concepts in Mucosal Immunity I. Antigen presentation in the intestine: new rules and regulations. *Gastrointest Liver Physiol*. 1998; G7-G9.
- Mayer L.** Mucosal Immunity. *Pediatrics*. 2003; 111 (6); 1595-1600.
- Mostefaoui Y, Bart C, Frenette M, Rouabhia M.** *Candida albicans* and *Streptococcus salivarius* modulate IL-6, IL-8, and TNF-alpha expression and

secretion by engineered human oral mucosa cells. *Cell Microbiol.* 2004 Nov; 6(11):1085-96.

Nisapakultorn K, Ross KF and Herzberg MC. Calprotectin Expression Inhibits Bacterial Binding to Mucosal Epithelial Cells. *Infect Immun.* 2001 June; 69(6): 3692–3696.

Owen CA, Campbell EJ, Hill SL, et al. Increased adherence of monocytes to fibronectin in bronchiectasis. Regulatory effects of bacterial lipopolysaccharide and role of CD11/CD18 integrins. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:626-631.

Özenci H, Çelik H İ, Tekeli F A and Aksoy A M. Comparison of Growth Inhibition Effect of CaCo2 Human Epithelial Cells and Polymorphonuclear Neutrophils on Various *Candida* Species. *Turkish Journal of Infection.* 2001; 15 (4); 527-532.

Park HS et al. Membrane cells in NALT: a portal of entry for the respiratory mucosal pathogen group A streptococcus. *The Journal of Immunology.* 2003; 171: 2532-2537.

Petterson CA et al. Airway inflammation and COPD. Epithelial-neutrophil interactions. *CHEST.* 2002; 121: 142S-150S.

Pichavant M et al. Outer membrane protein A from *Klebsiella pneumoniae* activates bronchial epithelial cells: implication in neutrophil recruitment. *The Journal of Immunology.* 2003; 171: 6697-6705.

Poynter ME et al. A prominent role for airway epithelial NFκB activation in lipopolysaccharide-induced airway inflammation. *The Journal of Immunology.* 2003; 170: 6257-6265.

Quayle AJ. The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *Journal of Reproductive Immunology.* 2002; 57 (1-29; 61-79).

Rastogi D et al. Host bacterial interaction in the initiation of inflammation. *Pediatric Respiratory Reviews.* 2001; 2: 245-252.

Reynolds HY. Modulating airway defenses against microbes. *Curr Opin Pulm,* 2002; 8(3):154-65.

Riedemann et al. Expression and function of the C5a receptor in rat alveolar epithelial cells. *The Journal of Immunology.* 2002; 168: 1919- 1925.

Rosseau S, Wiechmann K, Moderer S, Selhorst J, Mayer K, Krull M, Hocionke A, Slevogt H, Seeger W, Suttorp N, Seybold J, Lohmeyer J. *Moraxella catarrhalis-*

infected alveolar epithelium induced monocyte recruitment and oxidative burst. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004; Nov 19.

Shapiro SD. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med,* 1999; 160: S29-S32.

Singh PK et al. Production of β -defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95 (25): 14961-14966.

Steele C, Ozenci H, Luo W, Scott M and Fiedel P L. Growth Inhibition of *Candida* by Vaginal Cells from naive mice. *Medical Mycology.* 1999; 37; 251-259.

Steele C, Leigh J, Swoboda R and Fiedel PL. Growth inhibition of *Candida* by human oral epithelial cells. *The Journal of Infectious Diseases.* 2000; 182: 1479-1485.

Steele C, Leigh J, Swoboda R, Ozenci H and Fiedel P L. Potential role for a Carbohydrate Moiety in Anti-Candida Activity of Human Oral Epithelial Cells. *Infection and Immunity.* 2001; 69 (11); 7091-7099.

Stenberg S et al. Phagocytosis and innate immunity. *Current Opinion in Immunology.* 2002; 14:136-145.

Stockley RA. Neutrophil and the pathogenesis of COPD. *CHEST.* 2002; 121: 151S-155S.

Strober W, James SP. Interactions between epithelial cells and immune cell in the intestine. *Annals New York Academy of Sciences.* 1999: 37-45.

Svanborg C et al. Bacterial adherence and mucosal cytokine responses. Receptors and transmembrane signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1996; 797 (1):177-190.

Tetley TD. Macrophages and the pathogenesis of COPD. *CHEST.* 2002; 121: 156S-159S.

Underhill DM et al. Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology.* 2002; 14:103-110.

Welsh DA et al. Host defense in respiratory infections. *Medical Clinics of North America.* 2001; 85: 1329-1347.

Zheng L, Shum H, Tipoe GL, Leung R, Lam WK, Ooi GC, Tsang KW. Macrophages, neutrophils and tumour necrosis factor-alpha expression in bronchiectatic airways in vivo. *Respiratory Medicine,* 2001; 95:792-798.

VII. Ekler

a) Mali Bilanço ve Açıklamaları

Tüketime yönelik mal ve hizmet alımı, toplam; 8.300.000 Türk Lirası

b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar

Proje ile teçhizat alımı yapılmamıştır.

c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar

Yok

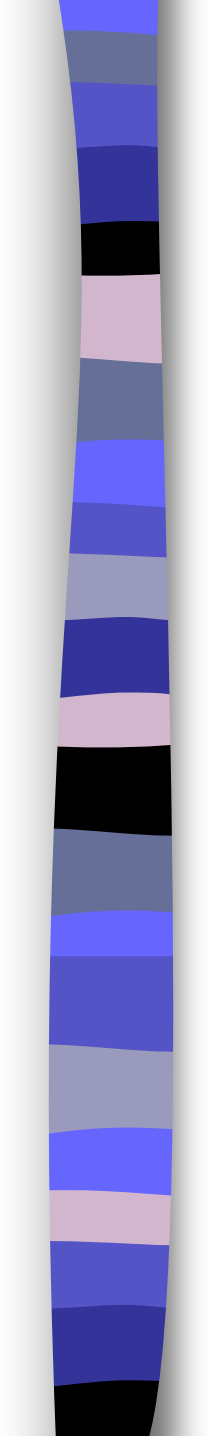
d) Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar)

Sözlü sunum;

Albayrak N, Biriken D, Özenci H. Kronik Obstüktif Akciğer Hastalığı Ve Bronşektazi Hastalarında Bronş Epitel Hücreleri ve Makrofajların Bakterisidal Etkisinin Araştırılması. Ulusal İmmünoloji Kongresi, Bursa, 2005.

e) Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler

Albayrak N, Biriken D, Özenci H. Kronik Obstüktif Akciğer Hastalığı Ve Bronşektazi Hastalarında Bronş Epitel Hücreleri ve Makrofajların Bakterisidal Etkisinin Araştırılması.

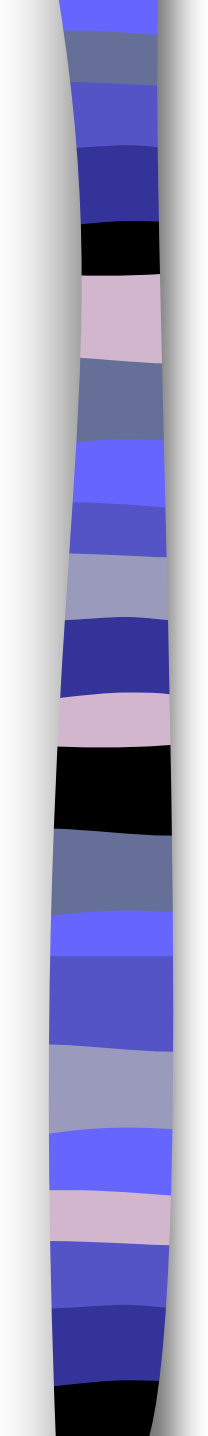


KOAH VEYA BRONŞEKTAZİ TANILI OLGULARDA BRONŞİYAL HÜCRELERİN ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Albayrak N*, Biriken D*, Ülger F**, Numanoğlu N**, Özenci H*

*AÜTF Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**AÜTF Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı

- 
- ✓ **KOAH;** hava yollarında ilerleyici tıkanıklık ile karakterize bir hastalık
 - ✓ **Bronşektazi;** bronşların geri dönüşümsüz genişlemesi ile karakterize kronik süpüratif akciğer hastalığı
- Her iki hastalık grubunda enfeksiyona eğilim artmıştır.



İki yaygın solunum patojeni;

✓ *Streptococcus pneumoniae*

✓ *Pseudomonas aeruginosa*

✓ Sağlıklı solunum yolları bakteriyel enfeksiyona karşı konağı korumak için çeşitli savunma yollarına sahiptir.

→ KOAH ve Bronşektazi hastalarının havayolu doğal immün yanıtlarında bozukluk var mı?



Çalışmamızda;

bronşiyal sıvılardan elde edilen hücrelerin

- ✓ *S.pneumoniae* ve *P.aeruginosa*'ye karşı hücresel ve sıvısal etkilerinin bir yansıması olan bakterisidal etkisini,
- ✓ Kontrol ile hasta grubu arasında antibakteriyel etkinlik açısından farklılığın olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır.



✓ Hemoptizi

✓ Artmış ve nedeni bilinmeyen dispne

✓ Değişmiş öksürük paterni

→ 13 bronşektazi ve 3 KOAH hastası

✓ Bilinen bir akciğer hastalığı olmayan

✓ Kuru öksürük etyolojisi araştırılan

✓ PA akciğer grafisinde, toraks BT'de nodüller saptanan

→ 9 kontrolün bronşiyal sıvısı alınmıştır.



Bronş lavaj sıvısının alınması.

✓ 15-20 cc SF ile

✓ 1cc SF ile

bronş lavajı sıvısı alınmıştır.

BAL ile yapılmış hiç çalışma yok!



Mikroorganizmanın hazırlanması.

- ✓ *S. pneumoniae* ATCC 49619 kanlı agara
- ✓ *P. aeruginosa* ATCC 10145 adi agara ekildi
 - bir gecelik inkübasyon
 - mo toplandı ve sulandırıldı
 - 3 kez yıkandı
 - çökelti sulandırıldı
 - tripan mavisini ile boyandı ve sayıldı
 - süspansiyon 1×10^5 /ml bakteri olacak şekilde ayarlandı.



Bronşiyal hücrelerin hazırlanması.

✓ Bronş lavajı sıvısı

→ 3 kez yıkandı, by içinde süspanse edildi

→ hücreler taze veya dondurulup çözülerek çalışıldı.

→ bronşiyal hücrelerin canlılığı ve karakteri tripan mavisi ile boyanarak değerlendirildi.

→ süspansiyon 1×10^5 /ml canlı hücre olacak şekilde ayarlandı.



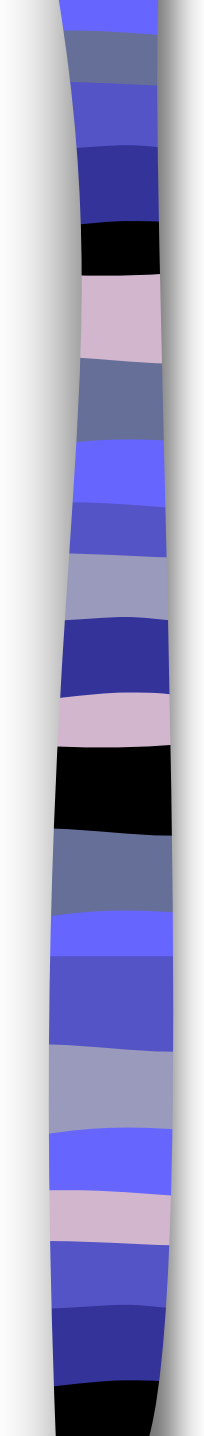
Üremenin engellenmesi deneyi.

- ✓ $1 \times 10^5/\text{ml}$ mo + $1 \times 10^5/\text{ml}$ bronşial hücre
→ 1:1 efektör/hedef hücre oranında mikroplakta karşılaştırıldı
→ mikroplak 37°C ve %5 CO_2 'li ortamda 15 ve 60 dakika inkübe edildi.
- ✓ Kontrol olarak mo ve bronşial hücreler tek başına kullanıldı.

Üremenin engellenmesi deneyi.

Mikroplak etüvden çıkarıldı;

- sulandırım yapıldı
- *S.pneumoniae* kanlı agara,
P.aeruginosa adi agara ekildi
- bir gecelik inkübasyona bırakıldı
- ertesi gün koloni oluşturan birimler sayıldı
- bakterisidal etki %'si hesaplandı.



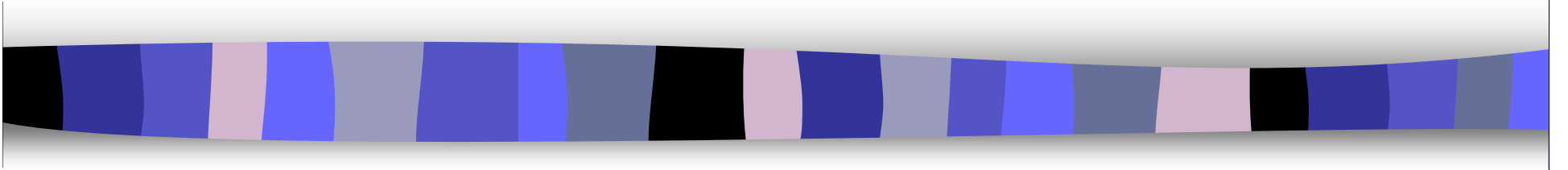
Bakterisidal etki %	<i>S.pneumoniae</i> ATCC 49619 15. dakika	<i>S.pneumoniae</i> ATCC 49619 60. dakika	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 10145 15. dakika	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 10145 60. dakika
Bronşektazi hastaları ortalaması (n=13)	28.2	27.8	25.3	20.9
KOAH hastaları ortalaması (n=3)	23.6	26.0	27.0	20.4
Hasta ortalaması (n=16)	27.8	27.5	25.7	20.7
Kontrol ortalaması (n=9)	31.5	27.5	27.2	19.1

S.pneumoniae ATCC 49619 ve *P.aeruginosa* ATCC 10145 suşuna karşı 1:1 efektör/ hedef hücre oranında üremenin engellenmesi deneyi sonucu



Sonuç

- Bronşiyal hücreler;
S.pneumoniae ATCC 49619 ve
P.aeruginosa ATCC10145'ye karşı
bakterisidal etki göstermiştir.
- Hasta ile kontrol grubu bronşiyal hücrelerinin
bakterisidal etkileri arasındaki fark,
istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



TEŞEKKÜRLER